

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370029

研究課題名(和文)節足動物及び脊椎動物を用いた環境に依存する性決定機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanisms for environmental sex determination

## 研究代表者

井口 泰泉 (IGUCHI, Taisen)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：90128588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：性決定や生殖戦略の多様性は、多様な種の確立に至る生物進化の分子基盤となっている。本研究は、アメリカワニとオオミジンコの環境依存型性決定機構をモデルとして、環境シグナルの受容機構と、そのような外部環境シグナルとホルモンを含む生体内環境調節因子との間の遺伝子・シグナルネットワークを明らかにすることを旨とした。アメリカワニでは、ゲノム解析を進め、温度感受性チャネルの各種TRPの機能解析を行うとともに、そのアゴニスト、アンタゴニスト曝露による性分化への影響を解析した。ミジンコでは、雄を誘導する幼若ホルモンに加えて、脱皮ホルモンの合成・分解酵素の遺伝子の同定により、甲殻類の内分泌系の理解を深めた。

研究成果の概要(英文)：Sex determination mechanisms can broadly be categorized by either a genotypic or environmentally driven mechanism. We investigated environmental sex determination (ESD) mechanism using American alligator and water flea (daphnia) as a models. We analyzed the thermosensitive cation channel, transient receptor potential (TRP), and its role during alligator temperature-dependent sex determination. Our electrophysiological and pharmacological approaches demonstrate that a thermal TRP is involved in the TSD in alligators and it directly activates male differentiation cascade. We also identified several juvenile hormone and ecdysone system-related genes, which are involved in sex determination pathways in Daphnia. The current results provide useful knowledge for understanding the mechanisms of sex determination system both in vertebrates and invertebrates.

研究分野：内分泌学

キーワード：性決定 環境 爬虫類 甲殻類

### 1. 研究開始当初の背景

現在、様々な動物の性決定機構が明らかとなりつつある。遺伝型性決定についてはショウジョウバエの *Sxl* やヒトやマウスの *Sry* の発見を端緒にした研究により、多種多様な性決定システムの詳細が分子レベルで明らかにされつつある。一方で、環境依存型性決定は、その存在こそよく知られているが、いまだ現象の記述のみにとどまっている。

申請者は様々な動物を用いて、環境依存型性決定の実体解明を目指している。爬虫類ではヘビ類を除き、多くのカメ類、数種のトカゲ、および全てのワニ類が温度依存型の性分化を行い、胚発生の時期の温度によって生殖腺の性が決まる。例えばアメリカワニの卵を 30 度で孵卵すると全て卵巣をもつ雌に、33.5 度で孵卵すると全て精巣をもつ雄として発生する。一方、節足動物であるミジンコ類は世界中の淡水に生息し、これまで生態学の研究に多く用いられてきた。ミジンコは通常単為生殖により繁殖するため、すべての卵は雌として発生する。しかし、環境条件の変化、例えば温度、光条件や個体密度の変化により、母親の卵巣中で雄へと運命づけられるものが現れる。すなわち環境の変化に伴って、性決定・生殖戦略を変えることにより、群としての生存環境への適応度を増やしているものと考えられる。申請者はこれまでに、幼若ホルモン類似体によって環境非依存的にミジンコの雄産仔が誘導されること、さらに昆虫類の性決定に重要な遺伝子である *Doublesex (Dsx)* がミジンコに対しても雄の性分化に重要であることを報告している。

### 2. 研究の目的

性決定や生殖戦略の多様性は、多様な種の確立に至る生物進化の分子基盤となっている。動物の性決定・分化については、多くの場合染色体の構成で決まるが、光や温度、個体密度など、周囲の環境によって性が決まる動物がいる(環境依存型性決定)。本研究は、アメリカワニ(ミシシッピーアリゲーター)と節足動物のオオミジンコの環境依存型性決定機構をモデルとして、環境シグナルの受容機構と、そのような外部環境シグナルとホルモンを含む体内環境調節因子との間の遺伝子・シグナルネットワークを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では生物の生育環境を精密に制御し、モデル化する必要がある。したがって、ワニの卵の採取はフロリダおよびサウスカロライナで行い、サウスカロライナ医科大学 Louis J. Guillette Jr. 教授の研究室で厳密な温度制御下で孵卵、薬剤曝露などを行い、胚組織及び mRNA、cDNA は許可を得て国内に持ち帰り解析した。TRPV の電気生理学実験はゼノパス卵母細胞を使用し、その活性化温度を同定

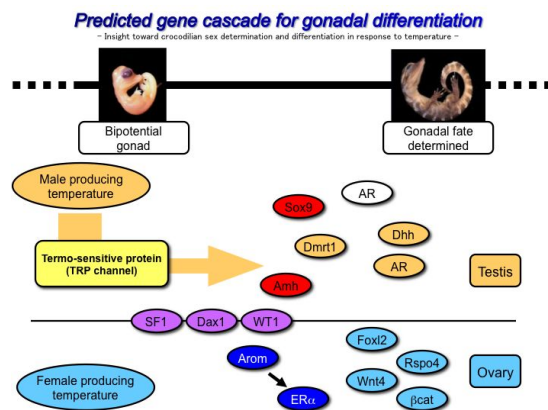
した。ミジンコに関しては、温度を含む外部環境を完全にコントロールできるマルチチャンバー式人工気象器内で飼育した。えさは一日一回クロレラを与えた。

動物実験に関しては、サウスカロライナ医科大学及び自然科学研究機構動物実験委員会、遺伝子組換え実験に関しては自然科学研究機構組換え DNA 実験安全委員会の承認のもと行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ワニの温度依存型性決定

ワニの環境(温度)依存型性決定について、環境シグナルの受容メカニズムとして、TRP チャンネルを中心とした解析を行った。その結果、温度感受性 TRP の一つである TRPV4 が雄産生温度域周辺で活性化されることを見出した(谷津ら、投稿中)。実際にこの TRPV4 が生体内でも性決定に関与するかどうかを調べるために、*in vivo* の実験として、TRPV4 のアゴニスト及びアンタゴニストを卵に塗布し、性腺および生殖管の遺伝発現解析および組織学的を行った。その結果、一部の雌雄遺伝子マーカーの発現変化が確認できた(谷津ら、投稿中)。また組織に関しても、一部孵卵度とは逆の性の性腺を示すものが確認できた。したがって、この TRP が、温度依存型性決定において最初のトリガーになる可能性が示唆された。以上の結果から、我々は TRP チャンネルが温度センサーとして作用し、これが一連の雄(精巣)決定カスケードの最上流に位置する下図のモデルを提案する(下図参照)。



さらにワニ(アリゲーター)については、ゲノムシーケンス解析が我々の研究室も参画する形で進んでいる(St Johnら、2012)。また、雌雄それぞれの温度で飼育したワニ胚から性腺を摘出し、RNA-seqによる網羅的遺伝子解析をおこない、ヒストン修飾酵素など、それぞれの温度で特異的に発現変化する遺伝子を複数同定した(谷津ら、投稿中)。しなしながら TRP から続く遺伝子発現の詳細に関しては、今後解析するタイムポイントを増やすなどして、さらなる解析を進めていく必要であると思われる。

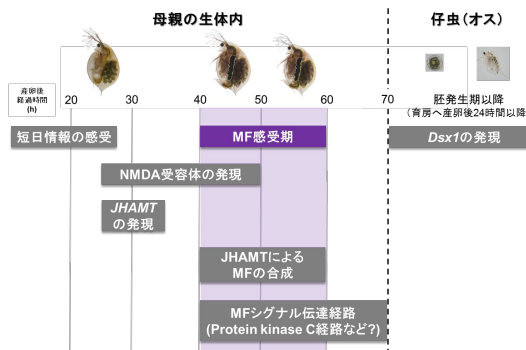
ワニの内分泌系の理解に向けて、雄の形質発現に重要なアンドロゲン受容体をクローニングし、機能解析を行った。その結果、ワニ特異的なスプライズバリエントが存在し、それがドミナントネガティブに作用することを明らかにした(宮川ら、投稿中)。爬虫類の性決定に関してはエストロゲンが雌の卵巣形成に不可欠であることが明らかにされている。今後、雄の精巣形成や、内分泌かく乱物質に対する反応性について解析していく予定である。

## (2) ミジンコの環境依存型性決定

ミジンコについて、我々はこれまでに幼若ホルモン曝露によって環境非依存的にオオミジンコの雄誘導が引き起こされることから、幼若ホルモンがオオミジンコの性決定に関与している可能性を明らかにしている(加藤ら、2011)。しかし、実際に環境条件の悪化を感知したオオミジンコ生体内において幼若ホルモン濃度が上昇し、そのシグナル伝達経路を介して雄産生が誘導されているのかは明らかになっていない。そのため、幼若ホルモンの雄誘導への関与を調べるために、実験室レベルにおけるミジンコ類の天然雄の誘導条件を決定した(海外で系統化されたミジンコ *Daphnia pulex* の WTN6 系統は、長日条件では雌、短日条件では雄の仔虫を誘導することができる; 豊田ら、2015)。この系を利用し、ミジンコの雄誘導条件下で幼若ホルモンの合成阻害剤の投与によって雄産生が阻害されること、幼若ホルモン生合成酵素である JHAMT がミジンコにおいても昆虫同様に幼若ホルモン(ファルネセン酸メチル)の合成能を有していること、ミジンコの性決定期直前において雄誘導条件特異的に JHAMT 遺伝子の一過的な発現上昇がみられることを明らかにした(豊田ら、2015)。

同様に本誘導系を用いて、ミジンコの性決定期における網羅的な遺伝子発現解析を行い、gene ontology (GO) を用いた enrichment 解析を実施した。その結果、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体に関連した GO term が短日(雄誘導)条件の卵巣や体全体のサンプルでより有意に発現変動していることを見出した。さらに、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体のアゴニストとアンタゴニストの曝露試験の結果、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体は幼若ホルモンの上流制御因子として雄誘導に関与していること、また、3 種類報告されている受容体サブタイプのうち N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型が主要な役割を担っていることも明らかになった(豊田ら、2015)。以上の結果から我々は、短日情報を受感した本系統は、NMDA 型受容体を介した JHAMT の発現制御により体内の幼若ホルモン濃度が上昇し、雄の仔虫が誘導されているというモデルを提案する(右上図参照)。

## WTN6系統の日長条件依存的な雄誘導モデル



さらに、内分泌系の関与を調べるために、脱皮ホルモンや、幼若ホルモンの生合成・分解を制御する遺伝子群を単離し、発現定量解析や幼若ホルモンの内分泌器官の同定のための解析を行い、ホルモンとミジンコの一連の発生過程との相互作用の一旦を明らかにした(角谷ら、投稿準備中)。

幼若ホルモンについては、Met と Src 複合体を、その受容体の候補遺伝子として同定した(宮川ら、2013)。昆虫を除く節足動物では、幼若ホルモン受容体の候補遺伝子としての初めての報告である。また、幼若ホルモン応答遺伝子についても、マイクロアレイ遺伝子発現解析などからいくつか候補を同定し(豊田ら、2014; 阿部ら、2015)、そのプロモーター解析から、甲殻類における幼若ホルモン受容体応答配列についての知見を深めた(宮川ら、投稿準備中)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 39 件) 全て査読有り

Toyota K, Miyakawa H, Hiruta C, Furuta K, Ogino Y, Shinoda T, Tatarazako N, Miyagawa S, Shaw JR, Iguchi T (2015) Methyl farnesoate synthesis is necessary for the environmental sex determination in the water flea *Daphnia pulex*. *J. Insect Physiol.* (in press). doi: 10.1016/j.jinsphys.2015.02.002.

Kohno S, Bernhard MC, Katsu Y, Zhu J, Byan TA, Doheny BM, Iguchi T, Guillette LJ Jr. (2015) Estrogen receptor 1 (ESR1; ER $\alpha$ ), not ESR2 (ER $\beta$ ), modulates estrogen-induced sex reversal in the American alligator, a species with temperature-dependent sex determination. *Endocrinology*, 156, 1887-1899. doi: 10.1210/en.2014-1852.

Miyakawa H, Sato T, Colbourne JK, Iguchi T (2015) Ionotropic glutamate receptors mediate inducible defense in the water flea *Daphnia pulex*. *PLoS ONE*, 10, e0121324. doi: 10.1371/journal.pone.0121324.

Toyota K, Miyakawa H, Yamaguchi K, Shigenobu S, Ogino Y, Tatarazako N, Miyagawa

S, Iguchi T (2015) NMDA receptor activation on the upstream of methyl farnesoate signaling for short-day induced male offspring production in water flea *Daphnia pulex*. BMC Genomics, 16, 186. doi: 10.1186/s12864-015-1392-9.

Hamlin HJ, Lowers RH, Kohno S, Mitsui-Watanabe N, Amano H, Hara A, Ohta Y, Miyagawa S, Iguchi T, Guillette LJ Jr. (2014) The reproductive hormone cycle of adult female American alligators from a Barrier island population. Reproduction, 147, 855-863. doi: 10.1530/REP-14-0031.

Abe R, Watanabe H, Yamamuro M, Iguchi T, Tatarazako N (2015) Establishment of a short-term in vivo screening method for detecting chemicals having juvenile hormone activity using adult *Daphnia magna*. J. Appl. Toxicol., 35, 75-82. doi: 10.1002/jat.2989.

Abe R, Toyota K, Miyakawa H, Watanabe H, Oka T, Miyagawa S, Nishide H, Uchiyama I, Tolleson EK, Iguchi T, Tatarazako N (2015) Diofenolan induces male offspring production through binding to the juvenile hormone receptor in *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol., 159, 44-51. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.11.015.

Hiruta C, Ogino Y, Sakuma T, Toyota K, Miyagawa S, Yamamoto T, Iguchi T (2014) Targeted gene disruption by use of transcription activator-like effector nuclease (TALEN) in the water flea *Daphnia pulex*. BMC Biotechnol., 14, 95. doi: 10.1186/s12896-014-0095-7.

Sumiya E, Ogino Y, Miyakawa H, Hiruta C, Toyota K, Miyagawa S, Iguchi T (2014) Roles of ecdysteroids for progression of reproductive cycle in the fresh water crustacean *Daphnia magna*. Front. Zool., 11, 60. 10.1186/s12983-014-0060-2.

Toyota K., Kato Y, Miyakawa H, Yatsu R, Mizutani T, Ogino Y, Miyagawa S, Watanabe H, Nishide H, Uchiyama I, Tatarazako N, Iguchi T (2014) Molecular impact of juvenile hormone agonists on neonatal *Daphnia magna*. J. Appl. Toxicol., 34, 537-544. doi: 10.1002/jat.2922.

Kohno S, Parrott BB, Yatsu R, Miyagawa S, Moore BC, Iguchi T, Guillette LJ Jr. (2014) Gonadal differentiation in reptiles exhibiting environmental sex determination. Sex. Dev., 8, 208-226. doi: 10.1159/000358892.

Miyakawa H, Toyota K, Hirakawa I, Ogino Y, Miyagawa S, Oda S, Tatarazako N, Miura T, Colbourne JK, Iguchi T (2013) A mutation in the Methoprene tolerant alters juvenile hormone

response in insects and crustaceans. Nat. Commun., 4, 1856. doi: 10.1038/ncomms2868.

Hiruta C, Toyota K, Miyakawa H, Ogino Y, Miyagawa S, Tatarazako N, Shaw J, Iguchi T (2013) Development of a microinjection system for RNA interference in the water flea *Daphnia pulex*. BMC Biotechnol., 13, 96. doi: 10.1186/1472-6750-13-96.

Toyota K, Kato Y, Sato M, Sugiura N, Miyagawa S, Miyakawa H, Watanabe H, Oda S, Ogino Y, Hiruta C, Mizutani T, Tatarazako N, Paland S, Jackson C, Colbourne JK, Iguchi T (2013) Molecular cloning of doublesex genes of four cladocera (water flea) species. BMC Genomics, 14, 239. doi: 10.1186/1471-2164-14-239.

Guillette LJ Jr., Iguchi T (2012) Life in a contaminated world. Science, 337, 1614-1615. DOI: 10.1126/science.1226985.

St John JA, Iguchi T, Kohno S, Guillette LJ Jr. et al. (48人中23人目) (2012) Sequencing three crocodylian genomes to illuminate the evolution of archosaurs and amniotes. Genome Biol., 13, 415. doi: 10.1186/gb-2012-13-1-415.

〔学会発表〕(計22件)

Miyagawa S, Yatsu R, Kohno S, Guillette L Jr., Iguchi T: Temperature-dependent sex determination and characterization of androgen system in American alligator. The 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology (ISAREN2014). 2014年11月7-9日、岡崎カンファレンスセンター、愛知県岡崎市

Tyler CR, Lange A, Hamilton P, Filby AL, Kudoh T, Miyagawa S, Takesono A, Lee O, Brown R, Osborne O, Paull GC, Moreman J, Green J, Cooper R, Iguchi T: Unravelling the effects of emerging contaminants in fish using molecular approaches. SETAC Asia/Pacific 2014 conference, 2014年9月13-18日、アデレード、オーストラリア

Iguchi T: Environmental sex determination in the water flea. SEB Annual Meeting, 2014年7月1-4日、マンチェスター、イギリス

Toyota K, Miyakawa H, Hiruta C, Sumiya E, Ogino Y, Miyagawa S, Iguchi T: Analysis of juvenile hormone as a sex-determining hormone in *Daphnia pulex*. EMBO Conference; *Daphnia* Genomics Consortium 2014, 2014年1月20-22日、バーミンガム、イギリス

Miyagawa S, Toyota K, Miyakawa H, Hiruta C,

Kato Y, Watanabe H, Tatarazako N, Paland S, Jackson C, Colbourne JK, Iguchi T: Cloning and their expression pattern of doublesex genes of cladocera. EMBO Conference; Daphnia Genomics Consortium 2014, 2014年1月20-22日、バーミンガム、イギリス

Sumiya E, Ogino Y, Miyakawa H, Hiruta C, Toyota K, Miyagawa S, Iguchi T: Ecdysteroids are involved in regulatory mechanism of a reproductive cycle in *D. magna*. EMBO Conference; Daphnia Genomics Consortium 2014, 2014年1月20-22日、バーミンガム、イギリス

Miyakawa H, Toyota K, Hirakawa I, Ogino Y, Miyagawa S, Oda S, Tatarazako N, Miura T, Colbourne JK, Iguchi T: A single amino acid substitution in Methoprene-tolerant (Met) alters juvenile hormone use by insects and Crustaceans. Insect Hormones International Workshop 2013, 2013年7月21-26日、ミネソタ、アメリカ

Iguchi T, Toyota K, Miyakawa H, Hiruta C, Ogino Y, Miyagawa S, Tatarazako N: Environmental sex determination of water flea, *Daphnia magna*. 17th International Congress of Comparative Endocrinology (ICCE 2013), 2013年7月15-19日、バルセロナ、スペイン

Iguchi T: Aquatic environments and endocrine activit. The regulatory approach in Japan. SETAC Europe 23rd Ann. Meet., 2013年5月12-16日、グラスゴー、イギリス

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/%7Ebioenv1/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井口 泰泉 (IGUCHI, Taisen)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：90128588

### (2) 研究分担者

宮川 信一 (MIYAGAWA, Shinichi)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号：30404354

荻野 由紀子 (OGINO, Yukiko)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教